

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/21126 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/50**

Selters (DE). **UNGER, Eberhard** [DE/DE]; Rosenweg
19, 07751 Jena-Cospeda (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10291

(74) Anwälte: **PFEIFFER, Rolf-Gerd** usw.; Winzerlaer Str.
10, 07745 Jena (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. September 2001 (06.09.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ,
EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 45 808.4 7. September 2000 (07.09.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **IMB INSTITUT FÜR MOLEKULARE
BIOTECHNOLOGIE E.V.** [DE/DE]; Beutenbergstr. 11,
07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BÖHM, Konrad**
[DE/DE]; Georg-Schumann-Weg 3e, 07747 Jena (DE).
NEUMANN, Tobias [DE/DE]; Erlenweg 16, 56242

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE ACTIVITY OF ACTIVE INGREDIENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION DER AKTIVITÄT VON WIRKSTOFFEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting the activity of active ingredients. Said method is especially used for finding inhibitors of the kinesin-load and kinesin-microtubule linkages. The aim of the invention is to provide one such method which enables rapid, cost-effective active ingredient screening having a high sample throughput and providing easy-to-obtain information about the inhibitory influence of the tested active ingredients. In order to achieve this, a carrier having a plurality of sampling areas which can be addressed, loaded, washed and sorted is provided; the sampling areas are provided with an affinity layer at least in partial areas; the affinity layers are then loaded with a solution of an active ingredient and kinesin molecules; the kinesin molecules are provided with a physically, chemically or biologically detectable marker, or the affinity layers are then coated with kinesin molecules and, after a washing, are loaded with a solution of an active ingredient and microtubules, the microtubules being provided with a physically, chemically or biologically detectable marker; and a washing is carried out and the loss or presence of kinesin molecules provided with the marker is detected from the result, or the loss or presence of the microtubules provided with the marker is detected.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen, das insbesondere bei der Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen Verwendung findet. Die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen, insbesondere für die Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen anzugeben, das ein schnelles, kostengünstiges Wirkstoffscreening mit hohem Probendurchsatz und einfach zu erlangenden Aussagen über den inhibitorischen Einfluß der getesteten Wirkstoffe ermöglicht, wird dadurch gelöst, daß ein Träger, mit einer Vielzahl adressierbar beschick-, wasch- und auslesbarer Probenaufnahmebereiche vorgesehen wird, wobei die Probenaufnahmebereiche zumindest in Teilbereichen mit einer Affinitätsschicht versehen werden, anschließend die Affinitätsschichten mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Kinesinmolekülen beschickt werden, wobei die Kinesinmolekülen mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker versehen werden, anschließend die Affinitätsschichten mit Kinesinmolekülen beschichtet und nach einem Waschschritt mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Mikrotubuli beschickt werden, wobei die Mikrotubuli mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker versehen werden, ein Waschschritt durchgeführt wird und im Ergebnis der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Kinesinmoleküle nachgewiesen wird oder der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Mikrotubuli nachgewiesen wird.



WO 02/21126 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen

Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen, das insbesondere bei der Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen Verwendung findet.

10 Es ist bekannt, daß filamentöse oder röhrenförmige Proteinassemblate, die über Bindungsstellen für Motorproteine verfügen, wie z.B. Mikrotubuli, als Bestandteile des Zytoskeletts lebender eukaryotischer Zellen gemeinsam mit mechanochemischen Proteinen, wie z.B. Kinesin, die auch als Motorproteine bezeichnet werden, verschiedene Funktionen bei zellulären Bewegungsvorgängen, wie z.B. beim Vesikeltransport, bei
15 der Zellteilung und bei der Zellbewegung, erfüllen.

Die Mikrotubuli haben Durchmesser von etwa 25 nm und Längen von einigen Mikrometern. Sie stellen Leitbahnen dar, an denen sich Motorproteinmoleküle, wie z.B. Kinesin, entlang bewegen. Die Energie für die Bewegung wird aus der Hydrolyse von Nukleotidtriphosphaten, vorzugsweise Adenosintriphosphat (ATP), durch Umwandlung von
20 chemischer in mechanische Energie geliefert (Kuznetsov S.A., Gelfand V.I., 1986: Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8530-8534; Cohn S.A., Ingold A.L., Scholey J.M., 1989: Quantitative analysis of sea urchin egg kinesin-driven microtubule motility. J. Biol. Chem., 264, 4290-4297).
25

Die Kinesine sind Proteine, die innerhalb ihrer Aminosäuresequenz verschiedene Domänen aufweisen, denen verschiedene Funktionen zuordenbar sind und die zum einen konservativ und zum anderen auch variabel sein können. Sowohl zwischen verschiedenen eukaryotischen Zelltypen als auch zwischen verschiedenen Spezies sind Sequenz- und
30 Funktionshomologien bekannt. Dabei sind die s.g. Motordomänen, die die Mikrotubulusbindungsdomänen und die ATP-Bindungsdomänen enthalten in ihrer Sequenz hoch konservativ. Für die s.g. Vesikelbindungsdomäne hingegen sind größere Sequenzvariationen bekannt (Conforti, L.; Buckmaster E.A.; Tarlton, A.; Brown, M.C.; Lyon, M.F. and M.P. Coleman; Mamm Genome 1999, 10: 617-622).
35

- 2 -

Die Vesikelbindungsstelle stellt einen Bereich innerhalb des Kinesinmoleküles dar, der die Eigenschaft besitzt, unterschiedliche Zellorganellen (z.B. Vesikel und Zentomeren) zu binden, was in direkten Zusammenhang mit der Sequenzvariabilität zu sehen ist und was diesen Molekülbereich zu einem interessanten Target für Wirkstoffe macht. Aufgrund der verschiedenen Bindungsstellenpartner wird die Vesikelbindungsstelle auch verallgemeinernd als Lastbindungsstelle bezeichnet, was im vorliegenden Text auch der Fall ist.

Es gehört zu Stand der Technik, die Mikrotubuli-Kinesin-Bewegungsvorgänge auch unter in vitro-Bedingungen ablaufen zu lassen. Entweder bewegen sich dabei kleine Partikel (z.B. Latexkugeln), die mit Motorproteinmolekülen, wie z.B. Kinesin, bedeckt sind, entlang von immobilisierten Mikrotubuli (Wang Z. H.; Khan S.; Sheetz M., 1995: Single cytoplasmic dynein molecule movements: Characterization and comparison with kinesin. Biophysical Journal, 69, 2011-2023) oder es bewegen sich, in Umkehrung der Verhältnisse, die Mikrotubuli zufallsverteilt über Motorproteinmoleküle, die auf einem Träger gebunden sind (Vale R.D., Reese T.S., Sheetz M.P., 1985: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, 42, 39-50).

Bei letzterem, dem sogenannten Gleitassay, sind die Kinesinmoleküle als Motorprotein auf einem Träger, z.B. Glas, gebunden und die zugesetzten Mikrotubuli werden durch die Aktivität des Kinesins in ihrer Längsrichtung richtungsorientiert vorwärtsbewegt (Vale R.D., Reese T.S., Sheetz M.P., 1985: Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, 42, 39-50).

Auch ist bekannt, daß die Mikrotubuli, die einen polaren Charakter besitzen, der sich darauf begründet, daß die Mikrotubuli aus parallel zueinander angeordneten Protofilamenten, die wiederum aus polaren Ketten von Tubulin-Dimeren bestehen, aufgebaut sind. In Folge dieser Polarität bewegen sich Motorproteine, z.B. Kinesin, typischerweise nur in einer Richtung auf dem Mikrotubulus entlang. Der selbständige Zusammenfindungsprozeß der einzelnen Dimere findet in vivo, aber auch in vitro, in flüssiger Umgebung statt. Bei dem in vitro Prozeß

- 3 -

können die Mikrotubuli in der Phase ihres Aufbaus in elektrischen Feldern parallelisiert werden (Vassiliv, P. M., Dronzine, R. T., Vassiliva, M.P. and G. A. Georgiev, 1982: Parallel arrays of microtubules formed in electric and magnetic fields. Bioscience Reports, 2: 1025-1029) bzw.
5 sie können anhand markerter Tubulin-Dimere markiert werden.

Weiterhin ist bekannt, daß die Markierung von Biomolekülen, wie z.B. auch von Mikrotubuli oder Kinesinmolekülen, durch den chemischen oder enzymatischen Einbau von Radioisotopen, wie bspw. Tritium,
10 Schwefel-35 oder Phosphor-32, von nichtradioaktiven Molekülen, wie bspw. Digoxigenin oder Biotin bzw. von nichtradioaktiven, fluoreszierenden Molekülen, wie bspw. Fluoresceinisothiocyanat oder 7-Amino-4-methylcumarin-3-acetat oder von metallischen Partikeln, wie bspw. Gold, erfolgen kann (Nicholl, D., S., T., 1995: Genetische
15 Methoden, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S.24-27).

Darüber hinaus ist bekannt, daß die Detektion der Anwesenheit bioaktiver Moleküle in Form von Antigenen, wie bspw. Peptiden oder Proteinen, mit spezifischen und markierten Antikörpern erfolgen kann.
20 Die Markierung der Antikörper erfolgt dabei durch Ankoppeln von Radioisotopen (z.B. Iod-125 oder Tritium) an Tyrosin- bzw. Histidinreste oder durch Ankoppeln von nichtradioaktiven Enzymen, wie bspw. alkalische Phosphatase oder Peroxidase, wobei die enzymatische Aktivität, bspw. durch die Umsetzung eines farblosen in ein farbiges
25 Produkt, gemessen wird, oder durch Ankoppeln von nichtradioaktiven Enzymen, wie bspw. Hämatin, das die chemilumineszente Reaktion von Wasserstoffperoxid und Luminol bewirkt, oder durch Ankoppeln von nichtradioaktiven Enzymen, wie bspw. Luciferase, die Biolumineszenz mittels phosphorilierten Luciferin bewirkt, oder durch das Ankoppeln
30 von metallische Partikeln, wie bspw. Gold (Liddell, E. und Weeks, I: 1996: Antikörpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S.87-107).

Die Signale der verwendeten verschiedenen Markermoleküle werden durch radio- oder elektrochemische, optische, piezoelektrische oder
35 kalorimetrische Verfahren zur Darstellung von molekularen

- 4 -

Erkennungsereignissen ausgewertet. Die Größe der Einzelsignalaussendenden Markermoleküle liegt dabei im Nanometerbereich.

Die meisten der derzeit verfügbaren und verwendeten Biomolekülnachweistechnologien beruhen auf der Detektion von fluoreszenzmarkierten Bindungspaa-
ren, die in einer spezifischen Art auf der Oberfläche festgehalten sind, wobei die Fluoreszenzdetektion durch optisches Auslesen der reaktiven Zentren des Arrays ausgeführt wird. Der Gebrauch von fluoreszierenden oder chemilumineszierenden Proben
findet dabei wie in den zuvor beschriebenen klassischen Methoden Anwendung und wird mit CCD-Imaging kombiniert (Eggers, M. et al., 1996: Professional Program Proceedings. Electro '96. IEEE, New York, NY, USA, 364pp.; Heller, M.J., 1996: IEEE-Engineering-in-Medicine-and-Biology-Magazine 15: 100-104).

Weiterhin ist bekannt, daß Biomoleküle elektrostatisch, bspw. über Oberflächen mit polaren Gruppen, oder biochemisch, bspw. mittels (Strept-)Avidin-beschichteter Träger, gebunden werden können. So findet z.B. das (Strept-)Avidin aufgrund seiner Eigenschaft, Biotinmoleküle spezifisch zu binden, Verwendung, um die mit Biotin versehenen Moleküle mit dem beschichteten Träger zu koppeln. Dadurch ist es möglich, Oligonukleotide, Lipide, Oligo- und Polysaccharide oder Peptide, die mit Biotin oder Biotinderivaten markiert sind, an die (Strept-)Avidin-Schicht des Trägers zu koppeln. (Liddell, E. und Weeks, I.: 1996: Antikörpertechniken, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, S.87-107).

Bekannte Testsysteme zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von Substanzen gegenüber den Bewegungsvorgängen von Motorproteinen basieren auf dem Gesamtzell-Assay (Mayer, Th. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L. and T. J. Mitchison, 1999: Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen, Science, 286: 971-974), und dem Gleitassay (Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Ray, K., Blackburn, Ch. L. Hopmann, C., Faulkner, D. J. and L. S. B Goldstein, 1998, A marine natural product inhibitor of kinesin motors, Science, 280: 292-295; Böhm, K. J.,

- 5 -

Steinmetzer, P., Daniel, A., Baum, M. and E. Unger, 1997: Kinesin-driven microtubule motility in the presence of alkaline-earth metal ions. Indication for calcium ion-dependent motility. Cell Motility and Cytoskeleton 37: 226 - 231).

5 Der Nachteil dieser Testsysteme ist jedoch, daß sie sich manueller Verfahren bedienen, die äußerst arbeitsaufwendig, zeitintensiv, nicht parallelisierbar und somit kostenträchtig und für Screenings mit einem hohen Probendurchsatz anhand von Substanzbibliotheken nicht geeignet sind.

10

Ein automatisches Verfahren zur Auswertung des Gleitassays ist bspw. aus der Publikation von C. Götz und anderen (Götz, C., Uttenweiler, D., Streubing, R. und R. H. A. Fink, 1999, Molekulare Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung von Motorproteinen, 15 Bioforum 3: 98-100) bekannt, bei dem die Gleitgeschwindigkeit von Motorproteinen bestimmbar ist. Diese Verfahren senkt den Arbeitsaufwand und ist parallelisierbar, besitzt aber den Nachteil, daß der Zeitaufwand für die Gleitgeschwindigkeitsmessung nicht verringert werden kann und daß die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop 20 und Bildverarbeitungstechnik erfolgt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß eine Vielzahl von molekularbiologischen Daten zu den Kinesinen (Motorproteinen) bekannt ist, aber aufgrund der aufwendigen Form der Aktivitätsmessung 25 über die Bewegungshemmung in Gleitassay eine breit angelegte Suche nach neuen Inhibitoren nicht aufwandgering ohne Mikroskop möglich ist.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Detektion 30 der Aktivität von Wirkstoffen, insbesondere für die Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen anzugeben, das ein schnelles, kostengünstiges Wirkstoffscreening mit hohem Probendurchsatz und einfach zu erlangenden Aussagen über den inhibitorischen Einfluß der getesteten Wirkstoffe ermöglicht.

35

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.

5 Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß bei dem Verfahren ein Träger mit einer Vielzahl adressierbar beschick-, wasch- und auslesbarer Probenaufnahmebereiche vorgesehen wird, wobei die Probenaufnahmebereiche zumindest in Teilbereichen mit einer Affinitätsschicht versehen werden, anschließend die Affinitätsschichten
10 mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Kinesinmolekülen beschickt werden, wobei die Kinesinmolekülen mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker versehen werden, ein Waschschrift durchgeführt und im Ergebnis dessen, der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Kinesinmoleküle
15 nachgewiesen wird.

Auf diese Art und Weise kann die inhibitorische Funktion von Wirkstoffen auf die Kinesin-Last-Bindung einfach detektiert werden, indem bspw. das Verfahren in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird und das Auslesen mit einem herkömmlichen Photometer erfolgt.

20 Alternativ dazu wird das Verfahren in der Art durchgeführt, daß im Anschluß an das Aufbringen der Affinitätsschichten diese mit Kinesinmolekülen beschichtet und nach einem Waschschrift mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Mikrotubuli beschickt werden, wobei die Mikrotubuli mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch
25 nachweisbaren Marker versehen werden, ein weiterer Waschschrift durchgeführt wird und im Ergebnis dessen der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Mikrotubuli nachgewiesen wird.

Auf diese Art und Weise kann die inhibitorische Funktion von
30 Wirkstoffen auf die Kinesin-Mikrotubuli-Bindung einfach detektiert werden, indem bspw. das Verfahren in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird und das Auslesen mit einem herkömmlichen Photometer erfolgt.

Die durch das Verfahren in den Probenaufnahmebereichen positionierten
35 Affinitätsschichten werden als zu den Vesikelbindungsdomänen der Kinesinmoleküle affine Bindungssubstrate, bspw. in Form von

Chromosomen oder Biomembranen bzw. deren molekularen Bestandteile oder in Form organischen Monoschichten, nach dem Stand der Technik auf den Träger aufgebracht.

Besonders vorteilhaft finden bei dem Verfahren negative
5 Oberflächenladungen als Affinitätsschicht Verwendung, was die Durchführung des Verfahrens erleichtert, da dadurch das Aufbringen der Affinitätsschicht in Form von Chromosomen, Biomembranen oder organischen Monoschichten entfällt.

Neben den Kinesinmolekülen können auch spezifisch modifizierte
10 Kinesinmoleküle für das Verfahren verwendet werden. Diese modifizierten Moleküle, die immer noch die Funktion der Lastbindungsdomänen aufweisen, werden nach dem Stand der Technik, bspw. als mikrobielle Fusionsproteine, gentechnisch hergestellt, indem die Motordomänen- und Mikrotubulusbindungsdomänen eliminiert
15 werden.

Die Kinesinmoleküle (oder die modifizierten Kinesinmoleküle) werden direkt mit Markern gekoppelt, die besonders vorteilhaft fluoreszierend sind. Möglich ist aber auch, entsprechend dem Stand der Technik, andere Marker zu verwenden.

20 Alternativ zur direkten Markierung können die Kinesinmoleküle (oder die modifizierten Kinesinmoleküle) gemäß dem Stand der Technik auch indirekt mit den Markern in der Art versehen werden, daß die Marker über spezifische Antikörper an die Kinesinmoleküle (oder die modifizierten Kinesinmoleküle) gekoppelt werden, was vorteilhaft für
25 die Untersuchung der Kinesin-Last-Bindung durchgeführt wird.

Zur Untersuchung der Kinesin-Mikrotubulus-Bindung werden bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Marker über die Mikrotubuli an die Kinesinmoleküle (oder die modifizierten Kinesinmoleküle) gekoppelt.

Die Markierung der Mikrotubuli erfolgt dabei nach dem Stand der
30 Technik, wodurch die Marker direkt oder indirekt an die Mikrotubuli gebunden werden.

Besonders vorteilhaft ist dabei gemäß dem Stand der Technik, die indirekten Kopplung der Marker über mikrotubulusspezifische Antikörper.

35 Da bei dem Verfahren als Marker fluoreszierende chemische Verbindungen eingesetzt werden, erfolgt die Detektion der Fluoreszenz

- 8 -

der Marker durch optisches Auslesen der Probenaufnahmebereiche des Trägers mittels eines klassischen Photometers, wie es bspw. zum Auslesen von Mikrotiterplatten Verwendung findet.

5 Eine Miniaturisierung des Auslesens kann auch in der Art erfolgen, daß der Träger ein Biochip ist, der auf seinen Spots gebunden die Kinesinmoleküle (oder die modifizierten Kinesinmoleküle) trägt und
vermittelt eines Auslesemoduls in Form CCD-Technologie kombiniert wird.

10 Da die Marker nicht nur fluoreszierende chemische Verbindungen sein können, kann die Detektion auch nach dem Stand der Technik mit anderen Auswerteverfahren mittels eines Auslesmoduls erfolgen.

Die Wirkungsweise des erfindungsgemäßen Verfahrens basiert auf der Blockade bzw. dem Lösen der Verbindung zwischen der
15 Affinitätsschicht und den Kinesinmolekülen (oder den modifizierten Kinesinmolekülen) in der Art, daß der Wirkstoff mit Inhibitorwirkung die Verbindung der Last-Bindungsdomäne zur Affinitätsschicht stört, so daß aufgrund dieser Interaktion eine ja/nein-Entscheidung getroffen werden kann, die ein schnelles, kostengünstiges Auslesen, bspw.
20 vermittelt Markereinsatz und Photometrie, ermöglicht, was gegenüber den bisher bekannten Tests, bspw. dem Gleitassay, einen großen Vorteil darstellt

Alternativ dazu können die Wirkstoffe mit Inhibitorfunktion, entsprechend ihrer Wirkungsweise, auch die Verbindung zwischen den
25 Kinesinmolekülen (oder den modifizierten Kinesinmolekülen) und den Mikrotubuli blockieren bzw. lösen, so daß aufgrund der vorstehend beschriebenen ja/nein-Entscheidung auch in diesem Fall ein schnelles, kostengünstiges Auslesen möglich ist.

30

Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen und den schematischen Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1: eine zum Verfahren verwendete Ausführungsform eines Trägers zur Testung des Kinesin-Last-Komplexes und

35 Fig. 2: eine zum Verfahren verwendete Ausführungsform eines Trägers zur Testung des Kinesin-Mikrotubulus-Komplexes.

- 9 -

Das erfindungsgemäße Verfahren wird z.B. für die Testung des Kinesin-Last-Komplexes ausgeführt, indem ein in Fig. 1 dargestellter Träger 2 aus Glas oder in Mikrotiterplattenform verwendet wird, der negative Oberflächenladungen aufweist, durch die die Affinitätsschicht 3 ausgebildet wird. Diese Affinitätsschicht 3 wird in den Probenaufnahmebereichen 1 in einem definierten Raster mittels eines Pipettierautomaten spotweise und Einzelproben zuordenbar mit einer Lösung beschickt. Diese Lösung wird aus einem Inkubationspuffer mit pH 6,8 bestehend aus 20 mM Pipes, 1 mM EGTA, 80 mM NaCl, 0,5 mM MgCl₂, 1 mM DTT sowie 100 bis 500 µg/ml Kinesin 4 und verschiedenen Einzelproben verschiedenster Wirkstoffe in einer Konzentration im nM- bis mM-Bereich zusammengesetzt.

Das Kinesin 4, im Beispiel das konventionelle neuronale Kinesin, ist dabei mit Oregon Green 514, einem Fluoreszenzfarbstoff als Marker 7, gekoppelt. Die Kopplung erfolgt in diesem Fall gemäß dem Stand der Technik vor dem Zusatz des Kinesins 4 zur Lösung.

Alternativ zu dieser Markierung wird ein modifiziertes Kinesin (Chromokinesin) hergestellt, indem gemäß dem Stand der Technik aus einem Klon (Accession N°AJ271784.1), der eine Deletion des Bereichs aufweist, der für den die Motordomäne und die Mikrotubulusdomäne tragenden N-Terminus des Kinesins 4 kodiert, die Plasmid-DNA isoliert und mit dem für das Grün-Fluoreszierende-Protein kodierende Plasmid (GFP-Plasmid) gekoppelt wird sowie dieses Kopplungsprodukt in *E.coli* gemäß dem Stand der Technik exprimiert wird. Das gebildete Fusionsprotein (modifiziertes Kinesin 4 mit direkt gekoppelten Marker 7) wird gemäß dem Stand der Technik isoliert. Alternativ zu dieser direkten Markierung kann das Kinesin 4, nach dem Stand der Technik, auch indirekte mit dem Marker 7 gekoppelt werden, bspw. über Antikörper.

Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 15 min mit der zuvor beschriebenen Lösung werden die Probenaufnahmebereiche mittels des Pipettierautomaten drei mal mit Inkubationspuffer zuzüglich 10 µM Taxol gespült.

Der Nachweis der vorhandenen markierten, bzw. der Nachweis des Verlustes des markierten Kinesins infolge der inhibitorischen Funktion einzelner zu testender Wirkstoffe wird mit einem üblichen Photometer

- 10 -

bei einer Wellenlänge von 511 nm (Green Oregon-Markierung) bzw. 395 nm GFP-Markierung) durchgeführt, so daß vermittels des Verfahrens und der Detektion gewonnenen ja/nein Aussagen bzgl. der Markers 7 Rückschlüsse zur inhibitorischen Funktion der getesteten
5 Wirkstoffe getroffen werden.

Für die Testung des Kinesin-Mikrotubus-Komplexes wird das Verfahren ausgeführt, indem ein in Fig. 2 dargestellter Träger 2 aus Glas oder in Mikrotiterplattenform verwendet wird, der negative
10 Oberflächenladungen aufweist, durch die die Affinitätsschicht 3 ausgebildet wird und diese Affinitätsschicht 3 in den Probenaufnahmebereichen 1 vermittels eines Pipettierautomaten spotweise mit einer Lösung beschickt wird. Diese Lösung wird aus einem Inkubationspuffer mit pH 6,8 bestehend aus 20 mM Pipes, 1 mM EGTA, 80 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT sowie 100 bis
15 500 $\mu g/ml$ Kinesin zusammengesetzt. Das Kinesin 4 wird dabei im Beispiel durch das konventionelle neuronale Kinesin gebildet. Nach der Kinesinanbindung, die 5 bis 15 min lang durchgeführt wird, werden die Probenaufnahmebereiche 1 vermittels des Pipettierautomaten drei mal mit Inkubationspuffer gespült.

20 Nach diesem Spülen werden die Probenaufnahmebereiche 1 in einem definierten Raster vermittels eines Pipettierautomaten spotweise und Einzelproben zuordenbar mit einer Lösung beschickt. Diese Lösung wird aus einem Inkubationspuffer mit pH 6,8 bestehend aus 20 mM Pipes, 1 mM EGTA, 80 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT sowie 20 bis
25 50 $\mu g/ml$ reassemblierter Mikrotubuli 5 und verschiedenen Einzelproben verschiedenster Wirkstoffe 7 in einer Konzentration im nM- bis mM-Bereich zusammengesetzt.

Die Mikrotubuli 5, im Beispiel in stabilisierenden Taxol aufgenommene neuronale Mikrotubuli, sind dabei mit Oregon Green 514, einem
30 Fluoreszenzfarbstoff als Marker 7, gekoppelt (direkte Markierung). Die Kopplung erfolgt in diesem Fall gemäß dem Stand der Technik vor dem Zusatz des Mikrotubuli 5 zur Lösung. Alternativ dazu kann auch, gem. dem Stand der Technik, eine indirekte Kopplung des Markers 7, bspw. über Antikörper, erfolgen.

35 Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 15 min mit der zuvor beschriebenen Lösung werden die Probenaufnahmebereiche 1 vermittels des

- 11 -

Pipettierautomaten drei mal mit Inkubationspuffer zuzüglich 10 μ M Taxol gespült.

- Der Nachweis der vorhandenen markierten, bzw. der Nachweis des Verlustes der markierten Mikrotubuli 5 infolge der inhibitorischen Funktion einzelner zu testender Wirkstoffe wird mit einem üblichen Photometer bei einer Wellenlänge von 511 nm durchgeführt, so daß 5
vermittels des Verfahrens und der Detektion gewonnenen ja/nein Aussagen bzgl. der Markers 7 Rückschlüsse zur inhibitorischen Funktion der getesteten Wirkstoffe getroffen werden .

- 12 -

Bezugszeichenliste:

1	-	Probenaufnahmebereich
2	-	Träger
3	-	Affinitätsschicht
4	-	Kinesinmoleküle
5	-	Mikrotubuli
6	-	Wirkstoff
7	-	Marker

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen bei dem ein Träger (2), mit einer Vielzahl adressierbar beschick-, wasch- und auslesbarer Probenaufnahmebereiche (1) vorgesehen wird, wobei die Probenaufnahmebereiche (1) zumindest in Teilbereichen mit einer Affinitätsschicht (3) versehen werden, anschließend entweder die Affinitätsschicht (3) mit einer Lösung aus einem Wirkstoff (6) und Kinesinmolekülen (4) beschickt wird, wobei die Kinesinmolekülen (4) mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker (7) versehen werden, oder die Affinitätsschicht (3) mit Kinesinmolekülen (4) beschichtet und nach einem Waschschrift mit einer Lösung aus einem Wirkstoff (6) und Mikrotubuli (5) beschickt wird, wobei die Mikrotubuli (5) mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker (7) versehen werden, ein Waschschrift durchgeführt wird und im Ergebnis entweder der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker (7) versehenen Kinesinmoleküle (4) nachgewiesen wird oder der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker (7) versehenen Mikrotubuli (5) nachgewiesen wird.
2. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätsschicht (3) als ein zu den Vesikelbindungsstellen des Kinesins (4) affines Binde substrat ausgeführt wird.
3. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätsschicht (3) durch Chromosomen oder deren molekulare Bestandteile gebildet wird.
4. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätsschicht (3) durch eine Biomembran oder deren molekulare Bestandteile gebildet wird.

- 14 -

5. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätsschicht (3) durch eine organische Monoschicht gebildet wird.
5
6. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitätsschicht (3) durch eine negative Oberflächenladung gebildet wird.
- 10 7. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Kinesinmoleküle (4) modifizierten Kinesinmolekülen eingesetzt werden, denen ihre Motordomänen und Mikrotubulibindungsdomänen fehlen.
15
8. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach den Ansprüchen 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die modifizierten Kinesinmolekülen als mikrobielle Fusionsproteine ausgeführt werden.
20
9. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Marker (7) indirekt mittels spezifischer Antikörper an die Kinesinmoleküle (4) oder Mikrotubuli (5) gebunden werden.
25
10. Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen nach den Ansprüchen 1 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß als Marker (7) fluoreszierende chemische Verbindungen eingesetzt werden.

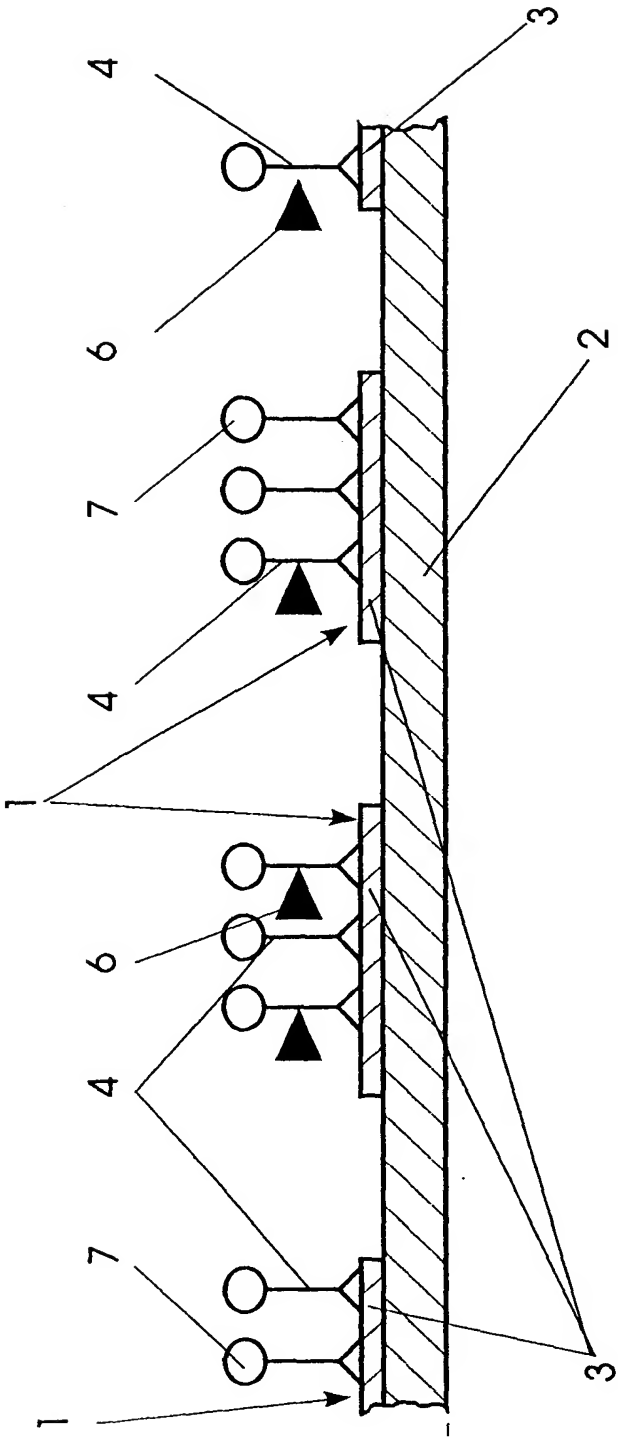


Fig.1

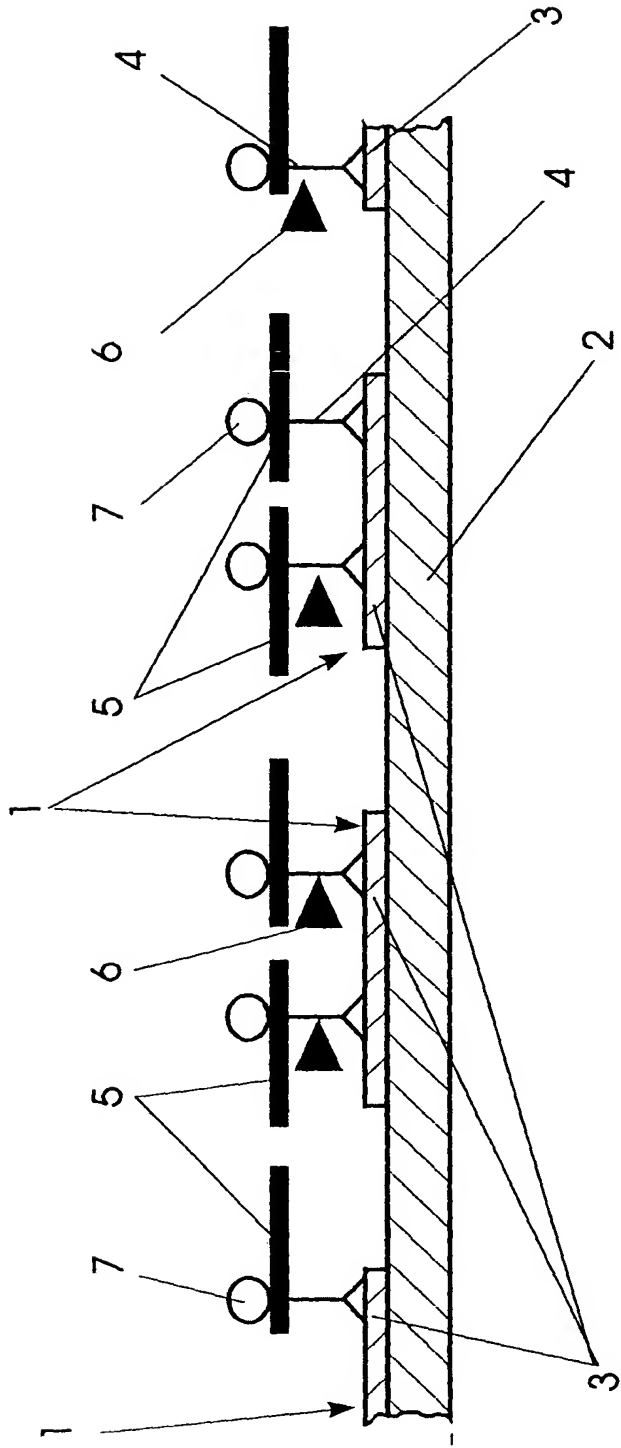


Fig.2

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
14. März 2002 (14.03.2002)

PCT

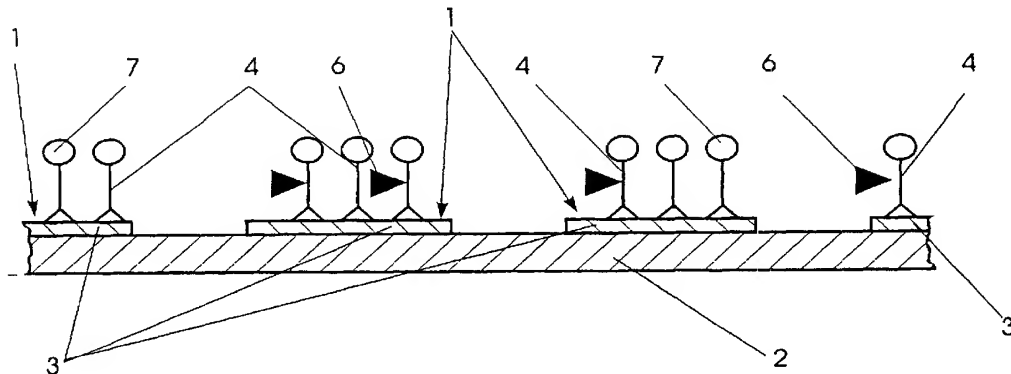
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/021126 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68** (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BÖHM, Konrad**
[DE/DE]; Georg-Schumann-Weg 3e, 07747 Jena (DE).
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10291 **NEUMANN, Tobias** [DE/DE]; Erlenweg 16, 56242
Selters (DE). **UNGER, Eberhard** [DE/DE]; Rosenweg
(22) Internationales Anmeldedatum: 6. September 2001 (06.09.2001) 19, 07751 Jena-Cospeda (DE).
(25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: **PFEIFFER, Rolf-Gerd** usw.; Winzerlaer Str.
10, 07745 Jena (DE).
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität: 100 45 808.4 7. September 2000 (07.09.2000) DE
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **IMB INSTITUT FÜR MOLEKULARE BIOTECHNOLOGIE E.V.** [DE/DE]; Beutenbergstr. 11, 07745 Jena (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING THE ACTIVITY OF ACTIVE INGREDIENTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DETEKTION DER AKTIVITÄT VON WIRKSTOFFEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting the activity of active ingredients. Said method is especially used for finding inhibitors of the kinesin-load and kinesin-microtubule linkages. The aim of the invention is to provide one such method which enables rapid, cost-effective active ingredient screening having a high sample throughput and providing easy-to-obtain information about the inhibitory influence of the tested active ingredients. In order to achieve this, a carrier having a plurality of sampling areas which can be addressed, loaded, washed and sorted is provided; the sampling areas are provided with an affinity layer at least in partial areas; the affinity layers are then loaded with a solution of an active ingredient and kinesin molecules; the kinesin molecules are provided with a physically, chemically or biologically detectable marker, or the affinity layers are then coated with kinesin molecules and, after a washing, are loaded with a solution of an active ingredient and microtubules, the microtubules being provided with a physically, chemically or biologically detectable marker; and a washing is carried out and the loss or presence of kinesin molecules provided with the marker is detected from the result, or the loss or presence of the microtubules provided with the marker is detected.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/021126 A3



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

Recherchenberichts:

5. Dezember 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen, das insbesondere bei der Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen Verwendung findet. Die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Detektion der Aktivität von Wirkstoffen, insbesondere für die Suche nach Inhibitoren der Kinesin-Last- und Kinesin-Mikrotubulus-Bindungen anzugeben, das ein schnelles, kostengünstiges Wirkstoffscreening mit hohem Probendurchsatz und einfach zu erlangenden Aussagen über den inhibitorischen Einfluß der getesteten Wirkstoffe ermöglicht, wird dadurch gelöst, daß ein Träger, mit einer Vielzahl adressierbar beschick-, wasch- und auslesbarer Probenaufnahmebereiche vorgesehen wird, wobei die Probenaufnahmebereiche zumindest in Teilbereichen mit einer Affinitätsschicht versehen werden, anschließend die Affinitätsschichten mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Kinesinmolekülen beschickt werden, wobei die Kinesinmolekülen mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker versehen werden oder anschließend die Affinitätsschichten mit Kinesinmolekülen beschichtet und nach einem Waschschrift mit einer Lösung aus einem Wirkstoff und Mikrotubuli beschickt werden, wobei die Mikrotubuli mit einem physikalisch, chemisch oder biologisch nachweisbaren Marker versehen werden, ein Waschschrift durchgeführt wird und im Ergebnis der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Kinesinmoleküle nachgewiesen wird oder der Verlust oder das Vorhandensein der mit dem Marker versehenen Mikrotubuli nachgewiesen wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/10291

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VON MASSOW A ET AL: "INTERACTION BETWEEN KINESIN MICROTUBULES AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2" CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON, vol. 14, no. 4, 1989, pages 562-571, XP008007379 ISSN: 0886-1544 abstract figure 3 ----- -/--	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 August 2002

Date of mailing of the international search report

13/09/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10291

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAKOWICZ R ET AL: "A MARINE NATURAL PRODUCT INHIBITOR OF KINESIN MOTORS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 280, 10 April 1998 (1998-04-10), pages 292-295, XP002211157 ISSN: 0036-8075 cited in the application abstract page 293, column 1, paragraph 3 ----	1-10
A	STEWART RUSSELL J ET AL: "Direction of microtubule movement is an intrinsic property of the motor domains of kinesin heavy chain and Drosophila ncd protein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 90, no. 11, 1993, pages 5209-5213, XP002211158 1993 ISSN: 0027-8424 page 5210, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 2 ----	1-10
P,A	WOOD KENNETH W ET AL: "Past and future of the mitotic spindle as an oncology target." CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, vol. 1, no. 4, August 2001 (2001-08), pages 370-377, XP002211159 August, 2001 ISSN: 1471-4892 page 375, column 1, paragraphs 3,4 -----	1-10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/10291

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	VON MASSOW A ET AL: "INTERACTION BETWEEN KINESIN MICROTUBULES AND MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 2" CELL MOTILITY AND THE CYTOSKELETON, Bd. 14, Nr. 4, 1989, Seiten 562-571, XP008007379 ISSN: 0886-1544 Zusammenfassung Abbildung 3 --- -/-	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

30. August 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13/09/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pellegrini, P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen

PCT/EP 01/10291

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SAKOWICZ R ET AL: "A MARINE NATURAL PRODUCT INHIBITOR OF KINESIN MOTORS" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, Bd. 280, 10. April 1998 (1998-04-10), Seiten 292-295, XP002211157 ISSN: 0036-8075 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 293, Spalte 1, Absatz 3</p>	1-10
A	<p>STEWART RUSSELL J ET AL: "Direction of microtubule movement is an intrinsic property of the motor domains of kinesin heavy chain and Drosophila ncd protein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 90, Nr. 11, 1993, Seiten 5209-5213, XP002211158 1993 ISSN: 0027-8424 Seite 5210, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 2</p>	1-10
P,A	<p>WOOD KENNETH W ET AL: "Past and future of the mitotic spindle as an oncology target." CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, Bd. 1, Nr. 4, August 2001 (2001-08), Seiten 370-377, XP002211159 August, 2001 ISSN: 1471-4892 Seite 375, Spalte 1, Absätze 3,4</p>	1-10